

The Effect of chick Embryonic Somites on Neural Rosette Formation in Mouse Embryonic Stem Cells

Sagha M., Ph.D., Esfandiari E., Ph.D., Karbalaee K., M.Sc., Tanhaee S., M.Sc., Nematoollahi M., B.Sc., Rabiee F., B.Sc., Karamali F., M.Sc., Razavi S., Ph.D, Nasr-Esfahani M.H., Ph.D. *, Baharvand H., Ph.D. **

** Molecular Biology Division and Stem Cell Division, Cell Science Research Center, Isfahan Campus, Royan Institute, ACECR, Isfahan, Iran*

*** Department of stem cells, Cell Science Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran*

Abstract

purpose: The aim of the present study is to understand if EBs can generate neural rosette upon co – culture with chick embryo somites.

Materials and Methods: The mouse ES cells, line Royan B1, were cultured in hanging drops to induce embryoid bodies (EBs) formation. Somites were isolated from the chick embryos and then embedded in alginate solution. Finally, alginate beads containing somites were co-cultured with EBs . RA was added to some EBs according to 2-/2+/2+ protocol

Results: Mean percentage of EBs containing early and late rosettes in somite, control and RA was 14.56%, 2.6% and 0.0% , respectively and what is important to rosette formation in EBs was the presence of neural inducing components as well as the time course of neural differentiation of EBs

Conclusion: Chick embryonic somites can induce ES cells –derived EBs to generate rosette structures with neuron formation capacity.

Key Words: Neural rosettes, Embryonic stem cells, Co-culture, Chick embryonic somites

تأثیر سومات‌های جنین جوجه بر تشکیل رزتهای عصبی در سلول‌های بنیادی جنینی موش

محسن سقا ^{Ph.D.*}، ابراهیم اسفندیاری ^{Ph.D.*}، خدیجه کرلایی ^{M.Sc.**}، سمیه تنهایی ^{M.Sc.***}، مرضیه نعمت‌الهی ^{B.Sc.**}، فرزانه ربیعی ^{B.Sc.***}، فرشته کرملی ^{M.Sc.**}، شهناز رضوی ^{Ph.D.*}، محمد حسین نصرافهانی ^{Ph.D.***}، حسین بهاروند ^{Ph.D.***}

* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

** گروه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، پایگاه تحقیقاتی اصفهان، اصفهان، ایران

*** گروه زیست‌شناسی مولکولی مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، پایگاه تحقیقاتی اصفهان، اصفهان، ایران

**** گروه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات علوم سلولی پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

تاریخ وصول: آبان‌ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: دی‌ماه ۸۷

چکیده

هدف: بررسی تشکیل رزتهای عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موش به دنبال هم‌کشتی با سومات‌های جنین جوجه در محیط آزمایشگاهی

مواد و روش‌ها: این مطالعه به روش تجربی انجام شد. از سلول‌های بنیادی جنینی رده Royan B1، به روش قطره آویزان اجسام شبه جنینی (EBs) تهیه شدند. سومات‌ها از جنین جوجه جدا شده و در محلول آلبینیت قرار داده شدند. در نهایت دانه‌های آلبینیت حاوی سومات با EB هم‌کشتی داده شدند. به برخی از EBها نیز مطابق با پروتکل $2+/2-2$ اسید رتینوئیک اضافه شد.

یافته‌ها: سومات‌ها توانستند سبب ظهور ساختارهای رزتی اولیه و بالغ در $14/56\%$ از EBها شوند در حالی که این میزان در گروه کنترل $2/6\%$ درصد و در گروه RA $0/0\%$ درصد بود. رزتها پس از جداسازی و کشت مجدد توانستند نورون تولید نمایند و مشخص شد که علاوه بر حضور عوامل القاگر عصبی، گذشت زمان نیز در تشکیل رزتها نقش دارد.

نتیجه‌گیری: سومات‌های جنین جوجه قادرند در محیط آزمایشگاهی باعث تشکیل ساختارهای رزتی در EBهای حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی موش شوند که قابلیت تولید نورون را دارند.

کلیدواژه‌ها: رزتهای عصبی، سلول‌های بنیادی جنینی، هم‌کشتی، سومات‌های جنین جوجه

مقدمه

کشیده هستند که مشابه مقطع عرضی لوله عصبی حول یک حفره مرکزی آرایش شعاعی می‌یابند. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که این ساختارها معمولاً طی تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی ظاهر می‌شوند [۱ و ۲] و تشکیل آنها اولین نشانه ظهور پیش‌سازهای عصبی حاصل از تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در محیط کشت است [۳ و ۴].

رزتهای عصبی شامل مجموعه‌ای از سلول‌های منشوری

آدرس مکاتبه: ۱. اصفهان، پایگاه تحقیقاتی اصفهان، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی،

مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه سلول‌های بنیادی، صندوق پستی: ۸۴۳۳ - ۸۱۵۸۹۶

E-mail: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org.

۲. تهران، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های

بنیادی، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

E-mail: baharvand@RoyanInstitute.org

ایجاد چنین ساختارهایی طی تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موش [۵] و میمون نیز گزارش شده است [۶].

رزت‌های عصبی به عنوان مدلی برای نوروزن در محیط زنده عمل می‌کنند؛ چرا که سلول‌های پیش ساز عصبی موجود در آنها همان ژنهای سلول‌های نوروایی تلیالی موجود در لوله عصبی را بیان می‌کنند [۳]. همچنین می‌توان با استفاده از آنها مکانیزم مولکولی تشکیل نورون‌های خاصی در بدن مانند نورون‌های دوپامین‌ریزی و یا نورون‌های حرکتی را مورد ارزیابی قرار داد [۸ و ۷]. بنابراین چنانچه اساس مولکولی تشکیل رزت‌ها شناخته شود نحوه تخصصی یافتگی اکتودرم عصبی در محیط بدن نیز مشخص خواهد شد [۳].

سلول‌های بنیادی جنینی موشی همانند سلول‌های بنیادی جنینی انسانی سلول‌های پرتوانی^۱ هستند که از جنین قبل از لانه‌گزینی در مرحله بلاستوسیست به دست می‌آیند که علاوه بر تکثیر دراز مدت در محیط کشت به عنوان سلول‌های تمایز نیافته توانایی تمایز به انواع سلول‌های اختصاصی و عملکردی را دارند [۹-۱۱]. این سلول‌ها علاوه بر این که منبع وسیعی از سلول‌ها را برای سلول درمانی بیماری‌های نورودژنراتیو فراهم می‌کنند با ایجاد ساختارهای سه بعدی و کروی شکلی به نام اجسام شبه جنینی (EB)^۲ مدل آزمایشگاهی مناسبی برای بررسی ابعاد مختلف مراحل اولیه تکامل جنینی پستانداران محسوب می‌شوند و می‌توان به وسیله آنها مکانیزم مولکولی نوروزن در بدن را درک نمود [۱۲ و ۱۳].

سلول‌های بنیادی جنینی موشی توانایی تبدیل به سلول‌های عصبی با استفاده از عوامل القاگر عصبی نظیر اسید رتینوئیک (RA)^۳ را دارند [۱۴] و می‌توان با استفاده از روش انتخاب دودمان به واسطه فاکتورهای رشد^۴ [۱۵] و روش حذف سرم^۵ [۱۶] و نیز هم‌کشتی^۶ این سلول‌ها با سلول‌های خاصی مثل

سلول‌های استرومایی مشتق از ناحیه آئورت - گناد - مزونفروس جنینی [۱۷]، SDIA^۷ [۱۸ و ۱۹] و همچنین محیط فراهم شده^۸ از عقده ریشه پستی نخاع جنین جوجه [۲۰] و آستروسیت [۲۱] از آنها نورون به دست آورد.

سومایت‌ها توده‌های سلولی از مزودرم پاراگزیمال جنینی هستند که در جنین سرطابداران^۹ و مهره داران وجود دارند. آنها در برخی از جنین‌ها مانند جنین جوجه، موش و ماهی گورخری طی یک فرآیند بسیار دقیق از ناحیه سری مزودرم پیش سومایتی^{۱۰} به صورت کره‌های اپی تلیالی جوانه می‌زنند [۲۲] و به غضروف، استخوان، عضله و درم پوست تمایز می‌یابند [۲۳]. آنها همچنین در تشکیل و مهاجرت سلول‌های ستیغ عصبی نقش دارند [۲۴ و ۲۵] و با ترشح رتینوئیدها باعث تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی صفحه عصبی سازنده مناطق مغز خلفی و نخاع به نورون می‌شوند [۲۸-۲۶].

در مطالعه قبلی نشان داده شد که سومایت‌های جنین جوجه به دنبال هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی جنینی موش توانایی القای عصبی این سلول‌ها را در محیط آزمایشگاهی دارند [۲۹]. بنابراین هدف از مطالعه حاضر پاسخ به این سؤال بود که آیا سومایت‌ها به دنبال القای عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موش می‌توانند باعث ایجاد رزت‌های عصبی در این سلول‌ها شوند و این که چه عواملی در تشکیل چنین ساختارهایی می‌توانند نقش داشته باشند.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی جنینی

تعداد 3×10^5 سلول بنیادی جنینی موش رده Royan B1 در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۶٪ CO₂ درصد روی فیبروبلاست‌های جنینی موشی تیمار شده با مایتومایسین در محیط

1. Pluripotential cells

2. Embryoid Body

3. Retinoic Acid

4. Growth factor - mediated lineage selection

5. Serum - free medium

6. Co-culture

7. Stromal cell derived inducing activity

8. Conditioned medium

9. Cephalochordate

10. Presomitic Mesoderm

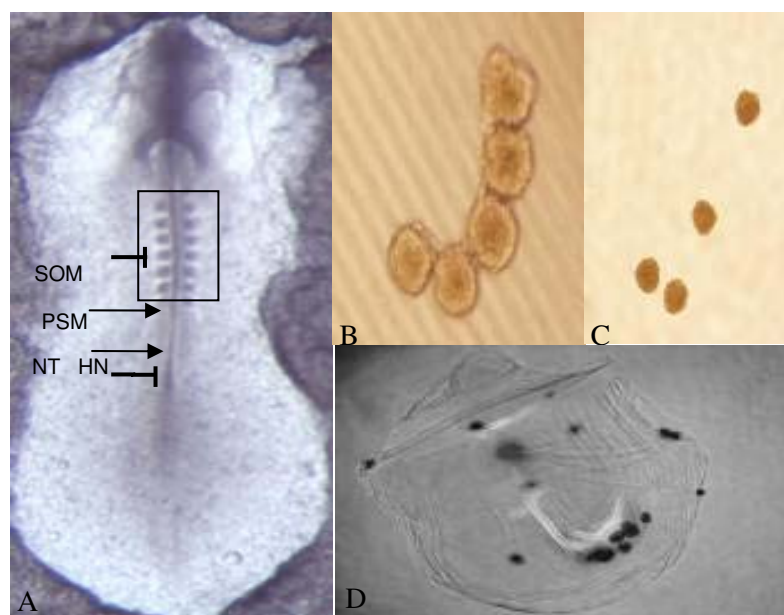
جداسازی سومایت از جنین جوجه

تخم مرغ‌های نطفه‌دار از مرکز اصلاح نژاد مرغ بومی اصفهان تهیه شدند و در ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد نگهداری شدند تا جنین‌های جوجه مطابق با جدول تکاملی هامبورگر- هامیلتون [۳۰] به مرحله ۵ - ۱۰ سومایتی برسند (شکل ۱A). سپس جنین‌ها از سطح زرده جدا شده و در محیط Leibovitz's (L15) قرار داده شدند. برای تفکیک لایه‌های اکتودرمی، مزودرمی و آندودرمی از هم و جداسازی راحت‌تر سومایت‌ها، جنین‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۴ ml آنزیم Dispase با غلظت ۱ mg/ml قرار داده شدند و پس از خنثی شدن اثر آنزیم توسط FCS 15:1، سومایت‌ها در زیر استرئومیکروسکوپ به کمک سوزن‌های انسولینی از جنین‌های جوجه جدا شدند (شکل ۱B و C).

۱۵% ES-FCS، K-DMEM، ۱ میلی مولار اسید آمینه غیرضروری، ۰/۱ میلی مولار بتا- مرکاپتواتانل، ۱ درصد ال- گلوتامین، ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین و U/ml ۱۰۰۰ عامل مهارکننده لوسمی^۱ (LIF) کشت داده شدند.

تهیه اجسام شبه جنینی (EB)

پس از جداسازی سلول‌های ES از سلول‌های فیروبلستی برای تهیه EB به روش قطره آویزان قطرات ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰۰ سلول در هر قطره در محیط ۱۰% ES-FCS، K-DMEM، ۱ میلی مولار اسید آمینه غیرضروری، ۰/۱ میلی مولار بتا- مرکاپتواتانل، ۱ درصد ال- گلوتامین، ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین بدون حضور LIF (محیط کشت سوسپانسیون) روی درب ظروف کشت باکتریایی به مدت دو روز کشت داده شدند (مرحله تشکیل EB).



شکل ۱. تصویری از جنین جوجه و سومایت‌های جدا شده از آن، (A) جنین جوجه در مرحله ۹ تکاملی، محدوده داخل کادر ناحیه گردنی جنین را نشان می‌دهد که واجد دو ردیف سومایت است، (B) تصویر میکروسکوپ فازکنتراست نواری از سومایت‌های ناحیه گردنی جدا شده از جنین، (C) که از هم تفکیک شدند و (D) برای جلوگیری از ادغام آنها با سلول‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی طی هم‌کشتی در داخل دانه‌های آلیجینیات قرار داده شدند. گره هنس (HN)، نوتوکورد (NT)، سومایت (SOM)، مزودرم پیش سومایتی (PSM).

1. Leukemia Inhibitory Factor

تهیه دانه‌های آلجینیت^۱ حاوی سومایت

چنانچه سومایت‌ها در مجاورت EB‌ها قرار بگیرند تمایل دارند به آن‌ها متصل شوند. به همین دلیل برای جلوگیری از ادغام آن‌ها، سومایت‌ها در داخل محلول آلجینیت قرار داده شدند (شکل ۱D). برای انجام این عمل، مقدار ۱/۲ گرم پودر آلجینیت در ۱۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۱۵ مولار NaCl حل شد تا محلول آلجینیت ۱/۲ درصد به دست آید. پس از دو بار شستشوی سومایت‌ها در PBS فاقد کلسیم و منیزیم، قطرات ۱۵ - ۲۰ میکرولیتر محلول آلجینیت حاوی سومایت (دانه‌های آلجینیت) به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱۰۲ میلی مولار CaCl_2 قرار داده شدند. این دانه‌ها پس از ۲ بار شستشو در محلول ۰/۱۵ مولار NaCl و یک بار شستشو در محیط کشت سوسپانسیون برای هم کشتی با EB به ظروف حاوی محیط کشت سوسپانسیون انتقال داده شدند و به مدت ۴ روز در مجاورت با EB‌ها در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۶ درصد نگهداری شدند (مرحله سوسپانسیون).

گسترش و تمایز EB

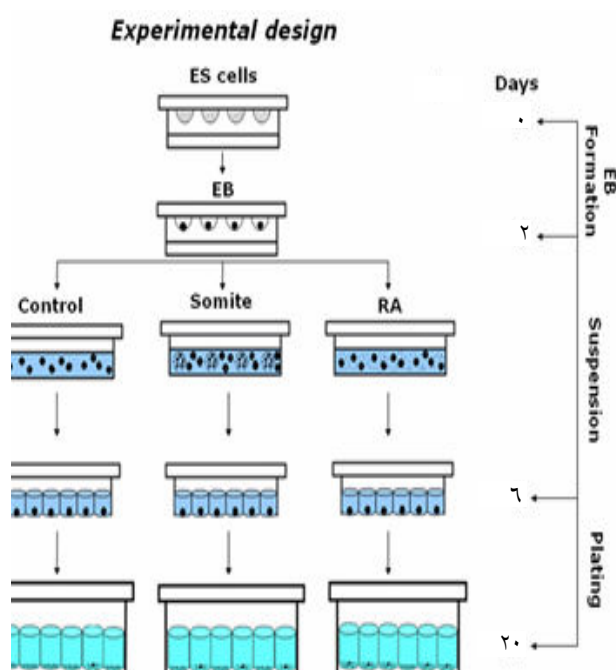
پس از ۴ روز هم کشتی EB‌ها با سومایت‌ها، EB‌ها به ظروف کشت ۲۴ خانه‌ای پوشش داده شده با ۰/۱ درصد ژلاتین که حاوی ۳۵۰ میکرولیتر محیط کشت ES-FCS، ۵K-DMEM، درصد ۱ میلی مولار اسید آمینه غیرضروری، ۰/۱ میلی مولار بتا - مرکاپتواتانل، ۱ درصد ال - گلوتامین، ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین (محیط کشت تمایزی) در هر خانه بود، منتقل شدند تا پس از گسترش تمایز یابند. در گروه کنترل نیز تعدادی از EB‌ها که تحت هم کشتی با سومایت قرار نگرفته بودند پس از ۴ روز سوسپانسیون به این ظروف انتقال داده شدند.

1. Alginate beads

اسید رتینوئیک (RA) در غلظت‌های بالا (10^{-6} M) نقش موثری در القای نورونی سلول‌های بنیادی جنینی دارد [۳۱ و ۳۴]. در این گروه تعدادی از EB‌ها در مرحله سوسپانسیون به مدت ۴ روز مطابق با پروتکل $2^{-}/2^{+}/2^{+}$ [۳۱] تحت تاثیر یک میکرومول (10^{-6} M) all-trans RA قرار گرفتند. بر طبق این پروتکل به مدت دو روز و بدون حضور RA، EB‌ها تشکیل شدند (2^{-})، سپس به مدت ۲ روز به آن‌ها RA اضافه شد (2^{+}) و پس از تعویض محیط کشت مجدداً EB‌ها به مدت ۲ روز دیگر تحت تاثیر RA قرار گرفتند (2^{+}). در نهایت القای نورونی EB کلیه گروه‌ها ارزیابی شد (شکل ۲).

جداسازی و کشت مجدد رزت‌ها

پس از ظهور رزت‌ها در EB، این ساختارها به کمک سوزن



شکل ۲. تصویر کلی از مراحل تشکیل اجسام شبه جنینی (EB) و هم کشتی آن‌ها با دانه‌های آلجینیت حاوی سومایت‌های جنین جوجه. در گروه کنترل EB‌ها تحت تیمار قرار داده نشدند و در گروه RA، EB‌ها تحت تاثیر اسید رتینوئیک با غلظت 10^{-6} M قرار داده شدند. پس از ۴ روز سوسپانسیون، EB‌های هر سه گروه به مدت دو هفته گسترش داده شدند.

دقیقه هضم شدند و روی ظروف کشت پوشیده شده با Polyornithin/Laminin در محیط N2B27 که به آن bFGF (۱۰ ng/ml) نیز اضافه شده بود مجدداً کشت داده شدند. پس از گذشت ۲-۳ روز نرونها ظاهر شدند.

ایمونوسیتوشیمی

EBها پس از دو بار شستشو با محیط فاقد سرم به مدت ۳۰ دقیقه در پارافمالدئید ۴ درصد در ۴ درجه سانتی گراد تثبیت شدند. پس از سه بار شستشو با PBS/Tween20، به مدت ۲۵ دقیقه برآنها Triton X-100 تاثیر داده شد. EBها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت با normal goat serum ده درصد بلوک شده و به صورت overnight در ۴ درجه سانتی گراد با آنتی بادی‌های اولیه بر ضد

mouse anti- β -tubulin III monoclonal Ab (Sigma, T8660)
mouse anti-Map-2 monoclonal Ab (Sigma, M1406)
mouse anti-Nestin monoclonal Ab (Chemicon, MAB353)
انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو با PBS/Tween20، EBها به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در معرض secondary fluorescein-conjugated anti-goat IgG (FITC) (Chemicon, AP124F) قرار گرفتند. پس از سه بار شستشو با PBS/Tween20 هسته سلولها با PI رنگ شد و مجدداً بعد از سه بار شستشو با PBS/Tween20 به کمک میکروسکوپ فلوروسنس Olympus مدل BX51 و با نرم افزار Olysia عکسهای لازم گرفته شد.

Semi-quantitive RT-PCR

کل RNA سلولی از سلولهای بنیادی جنینی و اجسام شبه جنینی همه گروهها با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit استخراج شد و پس از تیمار با RNase free DNase - مطابق با دستورالعمل سازنده reverse transcriptase II RNase H⁻ superscript ۴ transcriptase میکروگرم از RNA توتال برای سنتز cDNA در دمای ۴۲ درجه به مدت ۱ ساعت در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. برای پرایمرهای مختلف ۵۰ نانوگرم

انسولینی و پپیت پاستور از EBها جدا شده و در محیط کشت تمایزی مجدداً کشت داده شدند. از روش هضم آنزیمی نیز برای کشت مجدد رزتها استفاده شد. در این روش ابتدا به EBهای حاوی رزت آنزیم تریپسین به مدت ۳ دقیقه اضافه شد و پس از حذف تاثیر آنزیم با محیط سرم‌دار و شستشو با PBS، سوسپانسیون سلولی مجدداً در محیط کشت تمایزی کشت داده شدند.

تمایز عصبی به روش انتخاب دودمان^۱

تمایز عصبی سلولهای بنیادی جنینی موشی به روش انتخاب دودمان مطابق با پروتوکل Rolletchek با کمی تغییر صورت گرفت [32]. ابتدا برای تشکیل EB به روش قطره آویزان، قطرات ۲۰ میکرولیتر حاوی ۶۰۰ سلول در هر قطره در محیط ES-FCS 15، K-DMEM، ۱ درصد، ۱ میلی مولار اسید آمینه غیر ضروری، ۰/۱ میلی مولار بتا - مرکاپتواتانل، ۱ درصد ال - گلوتامین، ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین روی درب ظروف کشت باکتریایی به مدت دو روز کشت داده شدند. پس از دوروز سوسپانسیون EBها در محیط کشت K-DMEM، ES-FCS 20 درصد همراه با α -مونوتیوگلیسرول (α -MTG)، EBها به مدت ۱ روز در محیط کشت K-DMEM، ES-FCS 20 درصد فاقد α -مونوتیوگلیسرول در ظروف کشت ۶۰ میلی لیتری گسترش یافتند. در روز ششم محیط کشت EBها تغییر یافت و این توده ها در محیط فاقد سرم N2B27 که شامل DMEM/F12 + Neurobasal به نسبت ۱:۱ همراه با مکملهایی مانند انسولین (۲۵ μ g/ml)، ترانسفرین (۱۰۰ μ g/ml)، سلنیت سدیم (۳۰ nm)، B27، ۲ درصد، پروژسترون (۶ ng/ml)، پوترسین (۱۶ μ g/ml) و سرم آلبومین گاوی (BSA)^۲ بود کشت داده شدند. پس از گذشت ۱۲-۱۴ روز EBها های گسترش یافته با آنزیم تریپسین به مدت ۱

1. Neural lineage selection
2. Bovine Serum Albumin

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR

Gene	Primer Sequence (5' → 3')	AT (°C)	Length (bp)	Cycle
Oct3/4	F:GGCGTTCTCTTTGGAAGGTGTTCT R:CATACTCGAACCACATCCTTCTCT	۶۳	۳۱۸	۳۶
Nestin	F:TCGAGCAGGAAGTGGTAGG R:TTGGGACCAGGGACTGTTA	۵۵	۳۵۲	۳۰
Tuj1	F:GTTCCACGTCTCCACTTCTTC R:CCAGGTCATTGTTGCTCTC	۶۵	۴۷۹	۳۰
Map2	F:GCGGAAAACACAGCAGCAA R:TTGGAGGAGTGCGGATGATGG	۶۲	۴۳۴	۳۶
β-tubulin	F:TCACTGTGCCTGAACCTACC R:GGAACATAGCCGTAACTGC	۶۳	۳۱۹	۲۵

سومایت‌ها از جنین‌های ۵ تا ۱۰ سومایتی جوجه آن‌ها در دانه‌های آلبینیت قرار داده شدند.

در مطالعه قبلی نشان داده شد که سومایت‌ها اثر القایی در تولید نوروئ از سلول‌های ES دارند [۲۹]. نتایج RT-PCR نیز این یافته‌ها را تأیید کرد و مشخص شد که سومایت‌ها سبب بیان نشانگرهای نوروئ مانند nestin، β-Tubulin III و Map2 در نوروئ‌های حاصل از سلول‌های ES شدند. اگرچه میزان بیان این نشانگرها در گروه RA بیشتر بود (شکل ۳).

ظهور رزت عصبی

تشکیل رزت اولین نشانه تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی محسوب می‌شود [۳] اما یافته‌های ما نشان داد که ۱۱/۱۱ ± ۱۴/۶۸٪ از EB‌های گروه سومایت توانستند ساختارهای رزتی ایجاد کنند در حالی که این میزان در گروه کنترل ۱۱/۵۶ ± ۲/۶٪ و در گروه RA ۰/۰۰ ± ۰/۰۰٪ بود و از نظر آماری این تفاوت‌ها معنی‌دار بود ($p < 0.001$) (شکل ۴).

ساختارهای رزتی اولیه (Early-rosette) ۶-۸ روز پس از گسترش EB‌ها مشاهده شدند که نشانگر نستین را بیان می‌کردند (شکل ۵ A و B). پس از گذشت ۱۲-۱۴ روز این ساختارها به رزت‌های بالغ (Late-rosette) تمایز می‌یافتند که $6.36 \pm 116.44 \mu m$ قطر داشتند و همانند لوله عصبی نوروپی‌تلیوم با آرایش شعاعی حول یک حفره مرکزی تجمع

cDNA در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر در هر واکنش PCR استفاده شد. توالی پرایمرها و طول قطعات تکثیر یافته در جدول ۱ آورده شده است. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) الکتروفورز شدند و باندهای ایجاد شده به کمک نور UV مشاهده شدند. در نهایت بیان نسبی mRNA‌های مختلف نسبت به بیان β-tubulin mRNA با استفاده از نرم‌افزار Gene Tools تجزیه و تحلیل شد.

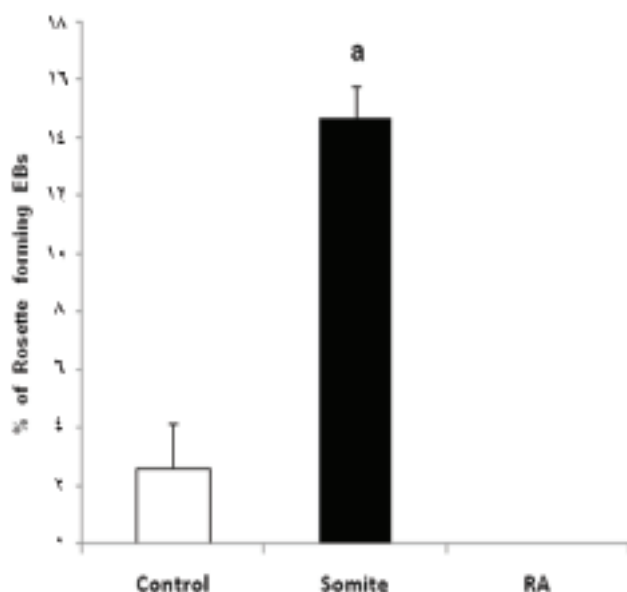
نتایج به‌دست آمده در این مطالعه تجربی، پس از تعیین $mean \pm SEM$ داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ و به کمک آزمون Tukey One-way ANOVA تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

القای عصبی سلول‌های ES موشی توسط RA و

سومایت

RA یکی از مهمترین مورفوزن‌هایی است که به صورت وابسته به غلظت سبب تمایز EB‌های حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی (ES) به انواع سلول‌ها از جمله سلول عصبی می‌شود [۳۱، ۳۳، ۱۴]. بنابراین، در این مطالعه از غلظت بالای (10^{-6} RAM) برای القای عصبی استفاده شد. برای جلوگیری از ادغام سومایت‌ها با EB‌ها پس از جدایی

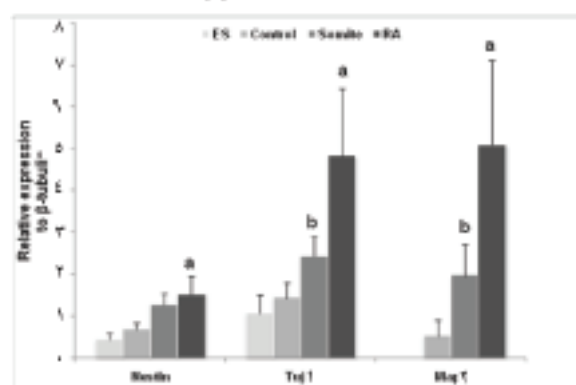
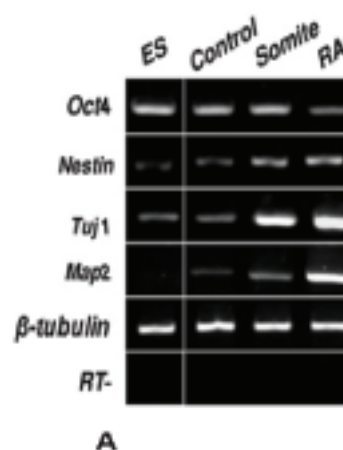


شکل ۴. درصدهای EB ایجاد کننده ساختارهای رزتی در گروه‌های مختلف. بیشترین درصد در گروه سومایت مشاهده می‌شود a: اختلاف معنی دار با گروه‌های کنترل و RA ($p < 0.001$, $n=5$).

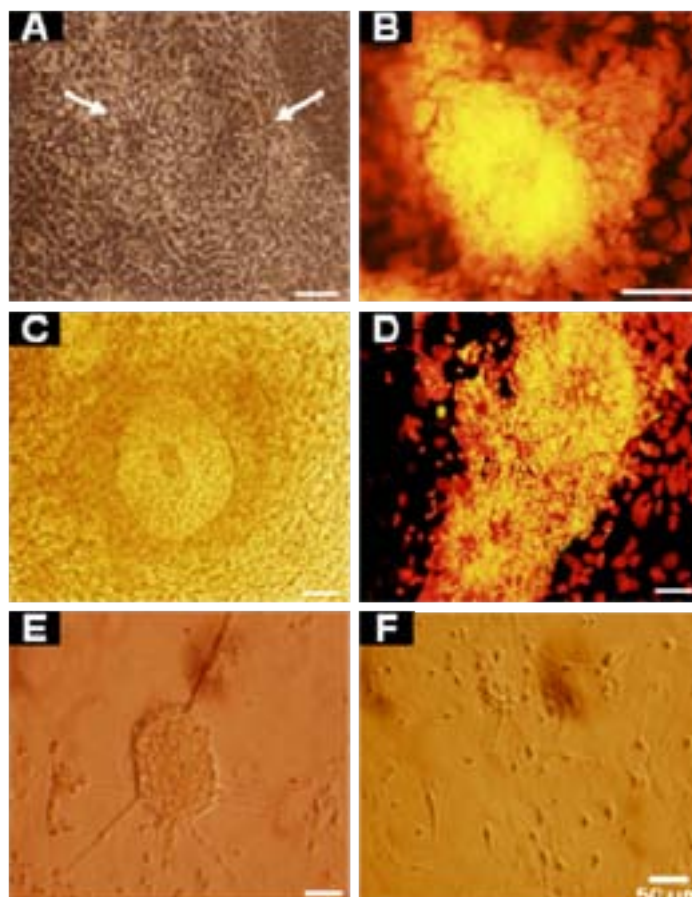
تشکیل رزت در روش تمایز عصبی به صورت انتخاب دودمان

تمایز عصبی به صورت انتخاب دودمان روشی است که سلول‌های اکتودرمی در محیط کشت فاقد سرم از EBهای سه لایه‌ای انتخاب می‌شوند و به سلول‌های عصبی تمایز می‌یابند [۳۴]. برای بررسی این نکته که آیا عامل زمان نیز در تشکیل رزت نقش دارد تعدادی از EBها به روش انتخاب دودمان تمایز عصبی یافتند که شیوه طولانی است. یافته‌های ما نشان داد که رزت‌ها در این روش هرچند بسیار کم تولید شدند ولی تولید آنها ۱۴ روز پس از گسترش EBها صورت گرفت (شکل ۷ A). پس از جداسازی آنزیمی و کشت مجدد در محیط فاقد سرم، رزت‌ها توانستند به نوروں تمایز یابند (شکل ۷ B) و نشانگر Map2 را بیان کنند (شکل ۷ C).

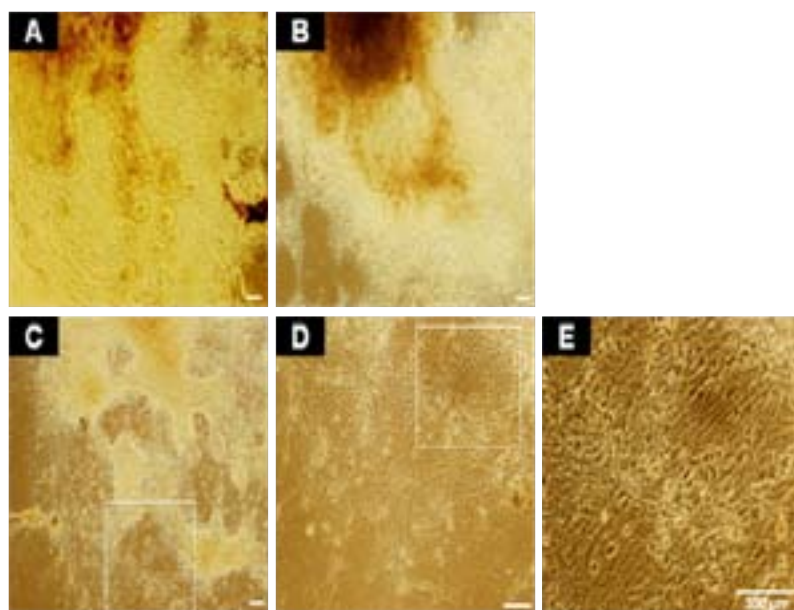
یافته بود. این ساختارها نشانگر Map 2 را بیان می‌کردند و نوروں‌های Map2⁺ در اطراف دیواره آنها مشاهده شدند (شکل ۵ C و D) و پس از جدا کردن آنها به روش‌های مکانیکی و آنزیمی از EB و کشت مجدد توانستند بعد از گذشت ۲ تا ۳ روز به نوروں تمایز یابند (شکل ۵ E و F). مرفولوژی دسته‌ای از رزت‌ها نیز با گذشت زمان از روز نهم تا دهم بعد از گسترش تغییر یافت (شکل ۶ A). آنها توانستند از وسط EB (شکل ۶ B) به طرف محیط جابجا شوند (شکل ۶ C) و طی روزهای ۱۰-۱۳ پس از گسترش به نوروں تمایز یابند (شکل ۶ D و E).



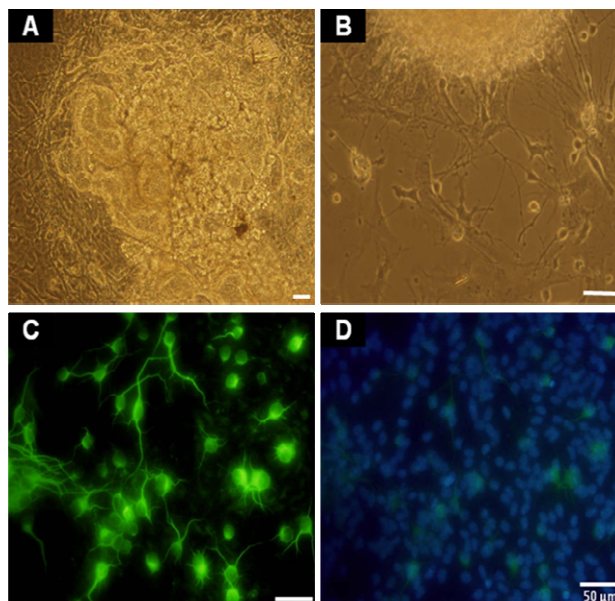
شکل ۳. بیان نشانگرهای نوروںی در گروه‌های مختلف. (A) بیان نشانگرهای نوروںی در گروه‌های سومایت و RA بیشتر از سایر گروه‌ها بود (B) آنالیز RT-PCR کمی نشانگرها نسبت به ژن β-tubulin. در گروه‌های سومایت این نسبت بیشتر از گروه کنترل بود ولی بالاترین نسبت در گروه RA مشاهده شد. a: اختلاف معنی‌دار با گروه‌های سومایت، ES و کنترل ($p < 0.01$), b: اختلاف معنی‌دار با گروه‌های ES و کنترل ($n=4$, $p < 0.05$)



شکل ۵. تشکیل رزت عصبی در EB های گروه سومايت. (A) تصوير میکروسکوپ فاز کنتراست از ساختارهای رزتی اولیه در گروه سومايت، پیکان‌ها رزت‌های اولیه را نشان می‌دهند. (B) بیان نشانگر نستین در رزت اولیه، (C) تصوير میکروسکوپ فازکنتراست از ساختارهای رزتی بالغ در گروه سومايت، (D) بیان نشانگر Map2 در رزت بالغ، (E) رزت بالغ پس از جدا شدن مکانیکی از EB و کشت مجدد، (F) تمایز سلول‌های حاصل از رزت به نورون.



شکل ۶. (A) تغییر مورفولوژی رزت‌ها در روز نهم، (B) تا دهم پس از گسترش و جابجایی آنها از وسط EB، (C) به سمت محیط در روز ۱۳ و تمایزشان به نورون، (D) بزرگنمایی بیشتر تصویر داخل کادر D، (E) بزرگنمایی بیشتر تصویر داخل کادر C و (F) بزرگنمایی بیشتر تصویر داخل کادر D.



شکل ۷. (A) تشکیل رزت در EB ها در روش تمایز عصبی به صورت انتخاب دودمان پس از ۱۴ روز گسترش، (B) یک روز پس از هضم آنزیمی رزت ها و کشت مجدد نورون ها ظاهر شدند و (C) نشانگر Map2 را بیان کردند، (D) رنگ آمیزی هسته ها با DAPI

بحث

با گذشت زمان از وسط به سمت محیط EB جابه جا شوند و فضای کافی برای گسترده شدن در اختیار داشته باشند قادرند به نورون تمایز یابند (شکل ۶).

بررسی های ایمونوسیتوشیمیایی رزت ها نشان می دهد که مشابه با سلول های نوروایی تیلیالی موجود در لوله عصبی، سلول های رزتی انواع نشانگرهای سلول های پیش ساز عصبی مانند Nestin، N-CAM، SoxB1 و Musashi-1 را بیان می کنند [۳]. یافته های این تحقیق نیز نشان داد که رزت های اولیه حاصل از تأثیر سومایت توانستند ۶ - ۸ روز بعد از گسترش EB، Nestin را بیان کنند که این نشان دهنده ماهیت پیش ساز عصبی سلول های سازنده رزت اولیه در این زمان بود (شکل ۵ و B). از طرف دیگر، مطالعات نشان دادند که سلول های در حال تکثیر نوروایی رزت های انسانی، Map2 را که در نورون ها تجلی می یابد بیان می کنند [۳]. حتی سلول های لایه خارجی دیواره رزت های موشی نشانگر نورونی β -Tubulin III را نیز بیان می کنند [۴] و این بیانگر خروج برخی از سلول های پیش ساز از چرخه سلولی و شروع تمایز نورونی است [۳]. در این بررسی نیز مشخص شد

سلول های بنیادی جنینی انسانی پتانسیل فراوانی برای تشکیل رزت به دنبال القای عصبی دارند و ظهور این ساختار نشانگر تمایز عصبی در آنهاست [۳، ۳۵] اما در روش های معمول القای عصبی سلول های بنیادی جنینی موش کمتر به ایجاد چنین ساختارهایی پرداخته شده است. چیبا (Chiba) و همکارانش در سال ۲۰۰۵ تشکیل رزت ها را به دنبال القای عصبی سلول های بنیادی جنینی موش با RA و سپس ۸ روز کشت توده های سلولی حاصل از این سلول ها را در محیط کشت DMEM/F12 + Fibronectin + N2 به صورت شناور و بدون چسبیدن به کف ظروف کشت گزارش کرده اند [۴]. در این مطالعه نیز برای اولین بار مشخص شد که EB های حاصل از سلول های بنیادی جنینی موش قادرند به دنبال هم کشتی با سومایت های جنین جوجه ساختارهای رزتی ایجاد نمایند که پس از جداسازی به روش مکانیکی و هضم آنزیمی و کشت مجدد توانستند پس از گذشت ۲ تا ۳ روز به نورون تمایز یابند (شکل ۵ و F). همچنین در این مطالعه مشاهده شد که رزت هایی که در وسط EB ها تشکیل می شوند چنانچه

که رزت های بالغ، ۱۷ - ۲۰ روز بعد از گسترش EB های موشی ظاهر شدند و نشانگر Map2 را بیان کردند (شکل ۵ C و D). ساختار این رزت ها مشابه لوله عصبی بود طوری که سلول های نوروایی تلایالی در چند ردیف به صورت شعاعی حول یک حفره مرکزی تجمع یافته بودند. این نتایج نشان می دهد که هرچند رزت های بالغ حاصل از تاثیر سومایت بر EB فنوتیپ نورونی را نشان ندادند ولی نشانگر Map2 را بیان کردند و شاید دلیل این امر این باشد که سلول های رزت های بالغ، احتمالاً در مراحل انتهایی پیش ساز عصبی یا ابتدایی تمایز نورونی به سر می برند. چرا که تعدادی نورون Map2⁺ در اطراف دیواره رزت ها مشاهده شدند (شکل ۵ D). تحقیقات نشان می دهند که مولکول های BMP4 با ممانعت از القای عصبی سبب تمایز اپیدرمی در اکتودرم می شوند ولی آنتاگونیست های آن مانند Chordin، Noggin و Folistatin با حذف تاثیر این مولکول بر اکتودرم باعث القای عصبی می شوند [۳۶] از طرف دیگر، سومایتهای جنینی قادرند رتینوئیدها و مولکولهایی مانند نوگین و فولیستاتین را ترشح نمایند [۲۸-۲۶ و ۳۷] و توانستند در محیط آزمایشگاهی به دنبال هم کشتی با EB های مشتق از سلول های بنیادی جنینی موش سبب تمایز عصبی در این سلول ها شوند [۲۹]. بنابراین به نظر می رسد علت تشکیل رزت های عصبی در گروه سومایت ناشی از حضور عوامل القاگر عصبی مترشح از سومایت در محیط کشت سلول های بنیادی جنینی باشد.

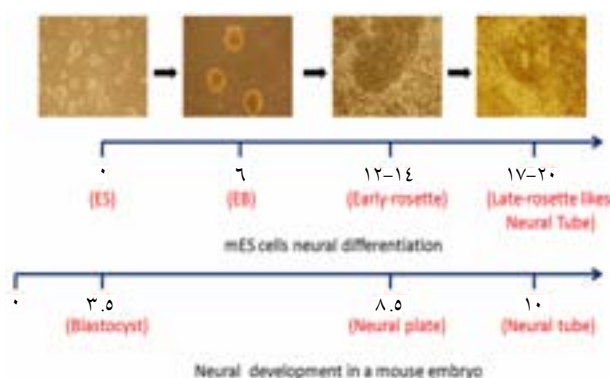
همچنین این احتمال وجود دارد که صرفاً وجود عوامل القاگر عصبی در محیط کشت برای ظهور رزت ها در سلول های بنیادی جنینی کافی نباشد و مدت زمان تمایز عصبی در این سلول ها نیز در تشکیل رزت ها نقش داشته باشد. در این رابطه، برای بررسی نقش عوامل القاگر عصبی در ایجاد رزت ها از اسید رتینوئیک مستقیماً برای تمایز عصبی سلول های بنیادی جنینی موش استفاده شد. بررسی های مختلف نشان داده اند که RA القاگر عصبی قدرتمندی است که در غلظت های بالا باعث تولید نورون از سلول های بنیادی

جنینی می شود [۱۴ و ۳۱]. یافته های قبلی نیز این توانمندی را تأیید کردند و مشخص شد که به دنبال القای عصبی سلول های بنیادی با غلظت ۱ میکرومول RA بیش از ۸۰ درصد از EB ها توانستند تمایز نورونی را نشان دهند [۲۹]. در این مطالعه نیز نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که بیان نشانگرهای نورونی در گروه RA بسیار شدید بود ولی برخلاف مطالعه چیا (Chiba) و همکارانش هیچ گونه رزت عصبی در EB های این گروه مشاهده نشد. در مطالعه Chiba توده های سلولی پس از تأثیر RA به مدت ۸ روز در حالت شناور در محیط کشت DMEM/F12 + Fibronectin + N2 قرار گرفتند و تحقیقات نشان می دهد که وجود فیبرونکتین برای نورولاسیون در جنین اولیه لازم است [۴] از این رو ساختارهای مشابه لوله عصبی در این مطالعه دیده شد. در مطالعه ای دیگر مشخص شد چنانچه سلول های بنیادی جنینی موش تحت تاثیر محیط فراهم شده حاوی Noggin قرار بگیرند بیش از ۸۸ درصد از سلول های بنیادی پس از ۳ روز به نورون تمایز می یابند ولی ساختار رزتی ایجاد نمی کنند [۳۸].

بنابراین به نظر می رسد حضور عوامل القاگر عصبی به تنهایی برای ایجاد رزت کافی نباشد. شاید دلیل این امر سرعت القای عصبی اسید رتینوئیک و مدت زمان تمایز عصبی سلول های بنیادی در محیط کشت باشد؛ چرا که در مطالعه قبلی مشخص شد نورون های حاصل از تاثیر این ماده در محیط کشت به سرعت پس از گذشت ۳ روز از گسترش EB ها ظاهر شدند در حالی که در گروه سومایت، نورون ها پس از گذشت ۸ روز ظاهر شدند. حتی در گروه کنترل نیز که رزت های بسیار کمی نسبت به گروه سومایت تولید شده بود (شکل ۴) القای عصبی پس از گذشت ۱۰ روز از گسترش EB ها صورت گرفت [۲۹].

برای بررسی دقیقتر نقش زمان در تشکیل رزت ها، در تحقیق دیگری از روش تمایز عصبی به شیوه انتخاب دودمان استفاده شد. تمایز عصبی براساس این روش کند و بطئی است. هرچند در این روش ساختارهای مشابه با رزت تا حدی مشاهده

از طرف دیگر همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد در گروه سومیت، رزت‌های اولیه ۶-۸ روز (۱۲-۱۴ روز پس از شروع تمایز سلول‌های بنیادی) و رزت‌های بالغ، ۱۱-۱۴ روز بعد از گسترش EB ها مشاهده شدند (۱۷-۲۰ روز پس از شروع تمایز سلول‌های بنیادی) (شکل ۸). این یافته‌ها با نتایج حاصل از تحقیقات قبلی که زمان ظهور رزت‌ها را ۱۲-۱۵ روز پس از شروع تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی گزارش کردند همخوانی داشت [۴ و ۳۴].



شکل ۸. تصویر شماتیکی از زمان تشکیل رزت‌های عصبی اولیه و بالغ در سلول‌های بنیادی جنینی موش و شکل‌گیری صفحه و لوله عصبی در جنینی موش

اگرچه نوعی مطابقت زمانی بین تشکیل رزت در سلول‌های بنیادی جنینی موش و انسان وجود دارد ولی زمان ظهور نوروپای تلیوم در اکتودرم جنینی و شکل‌گیری لوله عصبی در جنین موش بسیار زودتر از جنین انسان اتفاق می‌فتد. از طرف دیگر، زمان شکل‌گیری رزت‌ها در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی نیز یکسان گزارش نشده است و برخی از محققین زمان تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را طولانی‌تر از زمان شکل‌گیری نوروپای تلیوم جنینی دانسته‌اند؛ از این‌رو به نظر می‌رسد که هیچ‌گونه ارتباط زمانی بین فرآیند القای عصبی سلول‌های بنیادی جنینی با این پدیده در بدن جنین وجود ندارد.

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که در حضور Noggin دیواره رزت ضخیم می‌شود و حفره مرکزی آن‌ها نیز

شدند ولی به عنوان رزت‌های عصبی که مشابه با لوله عصبی به واجد یک حفره مرکزی مشخص باشند (رزت‌های بالغ) در نظر گرفته نشدند و صرفاً به عنوان تجمعات سلول‌های پیش‌ساز عصبی که نشانگر Nestin را بیان می‌کردند گزارش شدند [۳۴]. به هر حال سلول‌های پیش‌سازهای عصبی در این روش پس از گذشت بیش از ۷ روز از گسترش EB ها ظاهر شدند [۳۲ و ۳۴] در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که ساختارهای مشابه رزت ۱۴ روز پس از گسترش EB ها ظاهر شدند و توانستند پس از جدا شدن از EB های گسترش یافته به روش هضم آنزیمی و کشت مجدد پس از گذشت ۲ تا ۳ روز به نوروئید تمایز یابند (شکل ۷). به هر حال تعداد رزت‌ها در این روش نیز بسیار کم بود.

از طرف دیگر، در مورد مطابقت زمانی تشکیل نوروپای تلیوم در جنین و رزت‌ها در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی نیز ضد و نقیض‌هایی وجود دارد. برخی از محققین گزارش کردند که زمان تشکیل رزت‌ها به نوعی با زمان شکل‌گیری نوروپای تلیوم و لوله عصبی در بدن جنین انسان مطابقت دارد. این محققین زمان ایجاد رزت‌های اولیه را در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی ۸ تا ۱۰ روز بعد از تمایز عصبی گزارش کردند که با احتساب سن بلاستوسیست انسانی ۶ روزه که این سلول‌ها از آن جدا شدند (در کل ۱۴-۱۶ روز) این زمان را معادل با شروع گاسترولاسیون و تشکیل نوروپای تلیوم از اکتودرم در نظر می‌گیرند. همچنین تشکیل رزت بالغ را در روز ۱۵-۱۷ بعد از تمایز عصبی گزارش کردند که با احتساب سن بلاستوسیست (در کل ۲۱-۲۳ روز) این زمان معادل با پایان هفته سوم تکوین جنین انسانی و شکل‌گیری لوله عصبی است [۶، ۳۹ و ۴۰]. در مقابل، برخی دیگر از محققین زمان تشکیل رزت‌های عصبی را ۲۱ یا ۲۸ روز بعد از تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی گزارش نموده‌اند [۴۱]. این اختلاف زمانی ممکن است به نوع رده سلولی و یا روش مورد استفاده در تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مربوط باشد.

نسبت به گروه RA ضعیف‌تر نشان داد هر چند که بیان این نشانگرها در گروه سومایت بیشتر از گروه‌های کنترل و سلول‌ها بنیادی جنینی بود (شکل ۳). دلیل دیگر این امر ممکن است پتانسیل بالاتر سلول‌های بنیادی جنینی پستانداران عالی‌تر مانند انسان در تشکیل ساختارهای رزتی نسبت به پستانداران پست تر مانند موش باشد.

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی جنینی موشی قادرند به دنبال هم‌کشتی با سومایت‌های جنین جوجه ساختارهای رزتی را ایجاد نمایند. این رزت‌ها توانایی تمایز به نورون را پس از جداسازی و کشت مجدد دارند و چنانچه زمان و فضای کافی در اختیار داشته باشند می‌توانند با جابه‌جایی به سمت محیط EB به نورون تمایز یابند. در نهایت این بررسی‌ها نشان می‌دهند که وجود عوامل القاگر عصبی که تاثیر القایی سریعی دارند نمی‌تواند در تشکیل رزت‌ها در سلول‌های بنیادی جنینی مؤثر باشد و تشکیل این ساختارها به دنبال القای عصبی در دراز مدت صورت می‌گیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با استفاده از منابع مالی پژوهشکده رویان انجام شده است و نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده رویان به عمل می‌آورند.

باریک می‌شود [۴ و ۴۲]. رزت‌های مطالعه شده در تحقیق حاضر نیز چنین خصوصیتی را نشان دادند و مجموعه‌ای از ۴ - ۵ ردیف سلول دیواره رزت را تشکیل دادند که حول حفره مرکزی باریکی اجتماع کرده بودند و رزت‌ها به صورت ساختارهای متراکم با دیواره ضخیم مشاهده شدند. با توجه به این که سومایت‌ها Noggin ترشح می‌کنند [۳۷] شاید دلیل این امر وجود Noggin در محیط کشت EB ها باشد. در رابطه با میزان تولید رزت در سلول‌های بنیادی جنینی، مطالعات مختلف نشان می‌دهند که ساختارهای رزتی به وفور در EB های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی ایجاد می‌شوند [۳ و ۱۱] و بیش از ۷۰ درصد از سطح کشت این EB ها را به دنبال القای عصبی رزت‌ها اشغال می‌کنند [۲] در حالی که این میزان در مطالعه حاضر بسیار کمتر بود و درصد کمتری از EB های موشی توانستند تحت تاثیر سومایت رزت تولید نمایند (۱۴/۶۸ درصد)؛ هر چند این میزان نسبت به گروه‌های کنترل (۲/۶ درصد) و RA (صفر درصد) اختلاف معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴). دلیل پایین بودن درصد تشکیل رزت در EB مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی موش، ممکن است به پتانسیل ضعیف سومایت‌ها در القای عصبی این سلول‌ها برگردد که قادر به القای نورونی تقریباً ۳۵ درصد از EB ها بودند [۲۹]. نتایج RT-PCR نیز این یافته‌ها را تأیید نمود و بیان نشانگرهای نورونی همانند β -Tubulin III و Map2 را

References

1. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2001; 19:1129-33.
2. Shin S, Mitalipova M, Noggle S, Tibbitts D, Venable A, Rao R, et al. Long-Term Proliferation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neuroepithelial Cells Using Defined Adherent Culture Conditions. Stem Cells 2006; 24:125-38.
3. Wilson PG, Stice SS. Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells. Stem Cell Rev 2006; 2:67-77.
4. Chiba S, Kurokawa MS, Yoshikawa H, Ikeda R, Takeno M, Tadokoro M, et al. Noggin and basic FGF were implicated in forebrain fate and caudal fate, respectively, of the neural tube-like structures emerging in mouse ES cell culture. Exp Brain Res 2005; 163: 86-99.

5. **Kuo HC, Pau KYF, Yeoman RR, Mitalipov SM, Okano H, Wolf DP.** Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineage. *Biol Reprod* 2003; 68:1727-35
6. **Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hanen LO, Pearce RA, et al.** Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat. Biotech* 2005; 24:1-7.
7. **Lee H, AlShamy G, Elkabetz Y, Schofield CM, Harrison NL, Panagiotakos G, et al.** Directed Differentiation and Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Motoneurons. *Stem Cells* 2005; 25:1931-39.
8. **Baharvand H, Mehjardi NZ, Hatami M, Kiani S, Rao M, Montazer Haghighi M.** Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition. *Int J Dev Biol* 2007; 51: 371-8.
9. **Evans MJ, Kaufman M.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
10. **Martin GR.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-8.
11. **Thomson, JA, Itskovitz-Eldor, J, Shapiro, SS, Walnitz, MA, Swiergiel, JJ, Marshall, VS, et al.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-47.
12. **Keller G.** Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 2005; 19:1129-55.
13. **Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M.** Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 2000; 85(6): 645-51.
14. **Bain, G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI.** Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995; 168: 342-57.
15. **Guan K, Chang H, Rolletschek A, Wobus AM.** Embryonic stem cell-derived neurogenesis: Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res* 2001; 305:171-6.
16. **Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, Van der Kooy D.** Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 2001; 30: 65-78.
17. **O'Shea KS.** Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Biol Reprod* 2004; 71: 1755-65.
18. **Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, et al.** Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 2000; 28: 31-40.
19. **Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, et al.** Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1580-85.
20. **Kitazawa A, Shimizu N.** Differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons using conditioned medium of dorsal root ganglia. *J Biosci Bioeng* 2005; 100(1): 94-9.
21. **Nakayama T, Momoki-Soga T, Inoue N.** Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res* 2003; 46:241-9.
22. **McGrew MJ, Pourquie O.** somitogenesis: segmenting a vertebrate. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 487-93.
23. **Brent AE, Tabin CJ.** Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12:548-57.
24. **Kalcheim C, Goldstein RS.** Segmentation of sensory and sympathetic ganglia: interactions between neural crest and somite cells. *J Physiol* 1991; 85(3): 110-6.
25. **Koblar SA, Krull CE, Pasquale EB.** Spinal motor axons and neural crest cells use different molecular guides for segmental migration through the rostral half-somite. *J Neurobiol* 2000; 42(4): 437-47.
26. **Diez Del Corral R, Breitkreuz DN, Storey GK.** Onset of neuronal differentiation is regulated by paraxial mesoderm and requires attenuation of FGF signaling. *Development* 2000; 129:1681-91.

27. **Diez Del Corral R, Storey KG.** Opposing FGF and retinoid pathways: a signaling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis, *Bioessays* 2004; 26: 857-69.
28. **Diez Del Corral RDD, Martinez IO, Goreily A, Gale E, Maden M, Storey K.** Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern and neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 2003; 40: 65-79.
29. **Sagha M, Esfandiari E, Razavi S, Karbalaee K, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H.** Neuronal induction of mouse embryonic stem cells following co-culture with chick embryonic somites. *J Ir Anat Sci* 2008; 20:1-8. (Persian)
30. **Hamburger V, Hamilton HL.** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951; 88: 49-92.
31. **Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H.** Retinoic acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004; 275: 124-42.
32. **Rolletschek A, Chang H, Guan K, Czyz J, Meyer M, Wobus AM.** Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. *Mech Dev* 2001; 105: 93-104.
33. **Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM.** Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002; 110: 385-97.
34. **Okabe S, Nilsson KF, Spiro AC, Segal M, McKay DG.** Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 1996; 59: 89-102.
35. **Wei Du Z, Zhang SC.** Neural Differentiation from Embryonic Stem Cells: Which Way? *Stem Cells. Dev* 2004; 13: 372-81.
36. **Munoz-Sanjuan I, Hemmati-Brivanlou A.** Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev* 2002; 3: 271-80.
37. **Hirsinger E, Jouve C, Malapert P, Pourquie O.** Role of growth factors in shaping the developing somite. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140: 83-7.
38. **Gratsch TE, O'Shea KS.** Noggin and chordin have distinct activities in promoting lineage commitment of mouse embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 2002; 245: 83-94.
39. **Pankratz MT, Li XJ, LaVaute TM, Lyons EA, Chen X, Zhong SC.** directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage. *Stem Cell* 2007; 25: 1511-20.
40. **Krencik R, Zhang SC.** Stem cell neural differentiation: a model for chemical biology. *Curr Opin Chem Biol* 2006; 10: 592-7.
41. **Dhara S, Hasneen K, Machacek DW, Boyd NL, Rao RR, Stice SL.** Human neural progenitor cells derived from embryonic stem cells in feeder - free cultures. *Differentiation* 2008; 76:454-64.
42. **Itsykson P, Ilouz N, Turetsky T, Golstein R, Pera MF, Fishbein I, et al.** Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol Cell Neurosci* 2005; 30: 24-36.